

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-345650

(43)公開日 平成6年(1994)12月20日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	片内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/56	A D D	9454-4C		
31/70	A B J	9454-4C		
C 0 7 J 53/00		9051-4C		
63/00		9051-4C		

審査請求 未請求 請求項の数2 書面 (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平5-178441

(22)出願日 平成5年(1993)6月14日

(71)出願人 000001904

サントリー株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

(72)発明者 木曾 良信

大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号

サントリー株式会社生物医学研究所内

(72)発明者 児玉 亨

大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号

サントリー株式会社生物医学研究所内

(72)発明者 中原 光一

大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号

サントリー株式会社生物医学研究所内

最終頁に続く

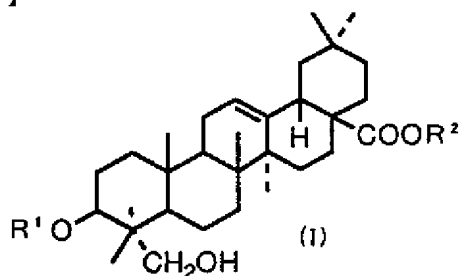
(54)【発明の名称】 ヘデラゲニン化合物を有効成分とする骨疾患の予防及び治療剤

(57)【要約】

【構成】 次の式(1)

【化1】

収性骨疾患の予防のための保健用飲食物としても有用である。



(式中、 $R^1$  および  $R^2$  は独立して水素原子またはグリコシル基を示す。)で表されるヘデラゲニン化合物を有効成分とする骨疾患の予防・治療剤。

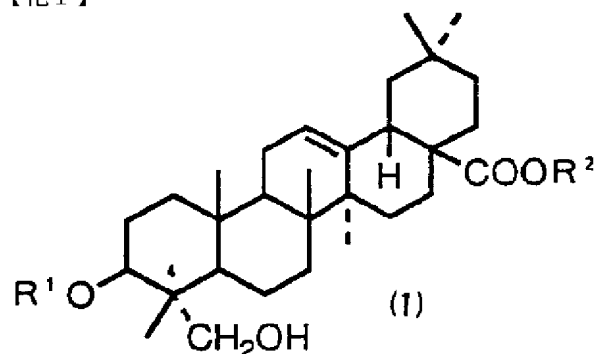
【効果】 本発明の有効成分は、PTHrp(1-34)により惹起された培養新生仔マウス頭蓋冠からのカルシウムおよび無機リン遊離を抑制することから、骨吸収作用を抑制することが確認され、吸収性骨疾患の予防または治療剤として有用である。また、本発明の有効成分を飲食物に添加して日常的に摂取することにより、吸

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の式(1)

【化1】



(式中、 $R^1$  および  $R^2$  は独立して水素原子またはグリコシル基を示す。) で表されるヘデラゲニン化合物を有効成分とする骨疾患の予防・治療剤。

【請求項2】 骨疾患が、悪性高カルシウム血症、骨ページェット病または骨粗鬆症である請求項1に記載の予防・治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、悪性高カルシウム血症、骨ページェット病または骨粗鬆症等の骨吸収性骨疾患の予防及び治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、高齢者人口の急激な増加と共に所謂老人病が増加している。中でも、骨粗鬆症をはじめとする骨疾患は骨折を多発し、寝たきり老人に繋がる疾病として、その予防と治療法の開発が望まれている。

【0003】 骨は一旦形成された後は全く変化しない構築物ではなく、骨形成と骨吸収のバランスの上にその構造および量は維持されている。従って、加齢あるいはその他の原因によりそのバランスが崩れると、種々の骨疾患を発症する。

【0004】 骨吸収の異常亢進によって起きる疾患としては、骨髄腫やリンパ腫などが原因で起こる悪性高カルシウム血症、局所性骨吸収によりもたらされる骨ページェット病、原因は不明であるが加齢により骨量が減少する骨粗鬆症等が挙げられる。

【0005】 骨は主に有機質であるコラーゲン線維と無機質であるカルシウム塩からなり、この両者が結びついて、張力にも圧力にも強い強固な構築物である骨が形成される。とりわけ、カルシウム塩は全骨重量の70%を占めるが、骨粗鬆症のような骨吸収性の骨疾患においては、その進行と共にカルシウム塩が骨から血液中に溶出して高カルシウム血症を伴い、骨からカルシウム塩が徐々に失われて行く。

【0006】 これまで、このような疾患の予防にはカルシウムを維持する方法が、また治療にはカルシウムを補

2

う方法が採用され、活性型ビタミンD<sub>3</sub> 製剤およびカルシウム製剤等が用いられてきた。また、骨からの脱灰を抑制する目的でエストロゲン製剤およびカルシトニン製剤のようなホルモン剤が用いられてきた。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 しかし、これらの薬剤の効果は、疼痛の軽減、病状の進行の防止等にはある程度の効果が認められるものの、その効果は満足のいくものではなく、より確実な効果を示す薬効成分が求められている。さらに、吸収性骨疾患の予防の目的で当該成分を日常的に摂取する場合は、経口摂取が望ましく、とりわけ飲食物の配合成分として、飲食物と共に摂取し得る安全性の高いものであることが望まれている。

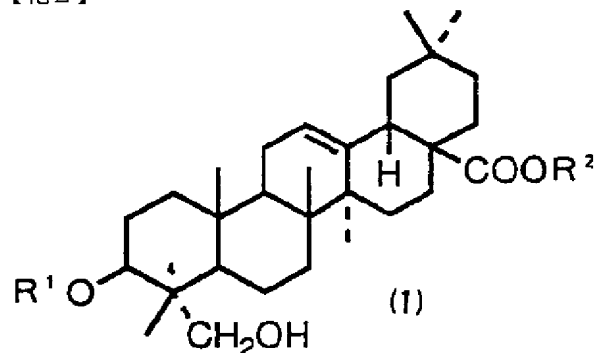
【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は先に、PT Hrp (副甲状腺ホルモン関連蛋白質) またはその活性フラグメントが誘発する培養新生仔マウス頭蓋冠からのカルシウムおよび無機リン酸遊離が、骨粗鬆症のような吸収性骨疾患のメカニズムと高い相関関係を有することを知った。そしてこの手法を用いて、吸収性骨疾患に対する予防および治療効果を種々の化合物について探索していたところ、ヘデラゲニン化合物がこの評価系で、カルシウムおよび無機リン酸の遊離抑制作用を示すことを見出し、本発明を完成した。

【0009】 すなわち、本発明は、式(1)

【0010】

【化2】



【0011】 (式中、 $R^1$  および  $R^2$  は独立して水素原子またはグリコシル基を示す。) で表されるヘデラゲニン化合物を有効成分とする骨疾患の予防・治療剤を提供するものである。

【0012】 本発明に用いられるヘデラゲニン化合物とは、ヘデラゲニン〔式(1)において $R^1$  および  $R^2$  が共に水素原子である化合物〕および式(1)において $R^1$  および/または $R^2$  の水素原子が種々のグリコシル基で置換したヘデラゲニン配糖体を意味し、例えばウコギ科キズタ (*Hedera tobleri*) のサボニン成分である $\alpha$ -ヘデリン、ウコギ科ハリギリ (*Kalopanax pictus*) より得られるカロパナック

30

40

50

スサポニンAおよびB (Chem. Pharm. Bul 1, 37巻 2号 311頁 1989)等のヘデラゲニン配糖体が例示できる。

【0013】また、後記実施例に示すように、アグリコンであるヘデラゲニン自体が骨吸収抑制作用を示すため、例えば、ヘデラゲニン-3-アラビノピラノシド〔式(1)において、 $R^1$ が $\alpha$ -アラビノピラノシル基であり $R^2$ が水素原子である化合物・以下Hed-3-araと略す。〕のような天然物の部分加水分解物や、種々の糖転移酵素反応等によって $R^1$ および/または $R^2$ に種々のグリコシル基を導入した種々のヘデラゲニン配糖体等も本発明に有効に用いることができる。

【0014】これらの化合物が骨吸収抑制の活性を示すためには、4位にRの立体配置でヒドロキシメチル基を有することが必須であり、例えば後記実施例に示すように、4-ジメチル体であるオレアノール酸は、4位の置換基以外はヘデラゲニンと全く同一の構造を有するにも係わらず、骨吸収抑制作用を示さない。

【0015】本発明に用いられるヘデラゲニン化合物は、例えばウコギ科ギズタ (*Hedera toble* 20 *ri*)、ウコギ科ハリギリ (*Kalopanax pictus*)、アケビ科アケビ (*Akebia quinata*)、キク科シオン (*Aster tataricus*)、キンボウゲ科コマセンニンソウ (*Clematis mandshurica*)、イチリンザキセンニンソウ (*Clematis brachyura*)、トベラ科トベラ (*Pittosporum tobira*) およびムクロジ科ムクロジ (*Sapindus mukurossi*)等の植物体から精製された天然物でも、公知の方法により合成された合成品であっても良 30 い。また、天然物を用いる場合は、必ずしも純品にまで精製する必要はなく、本発明の効果を損なわない範囲で、抽出物、粗精製物、種々のヘデラゲニン化合物の混合物等を用いることができる。

【0016】本発明に用いられるヘデラゲニン化合物は、植物成分として得られる既知化合物であるが、これらの化合物が、骨吸収抑制作用を示し、骨粗鬆症等の吸収性骨疾患に有効であるとの知見はない。

【0017】本発明に用いるヘデラゲニン化合物は、単 40 独で用いても良いが、種々のヘデラゲニン化合物を有効成分として組み合わせて用いることもできる。

【0018】本発明の吸収性骨疾患の予防・治療剤を製造するには、上記のヘデラゲニン化合物を有効成分とし、常法に従って公知の医薬品用担体と組合わせて製剤化すれば良い。

【0019】本発明の有効成分は常法に従って種々の剤型での投与が可能である。例えば経口投与剤としては、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、細粒剤、シロップ剤、ドライシロップ剤等が例示でき、非経口投与剤としては、注射剤の他、坐薬、膣坐薬等の坐剤、噴霧剤等の経鼻投与 50

剤、軟膏、経皮吸収性テープ等の経皮吸収剤が例示できる。

【0020】また、本発明の有効成分を通常の飲食物中に添加して、日常的に摂取することも可能である。添加し得る食品の種類には特に限定はないが、本発明の有効成分には特有の風味があるため、例えばドリンク剤等の飲料や、キャンディー等の甘味の強い食品に、食品本来の味を損なわない範囲である0.01~1重量%程度を添加することが好ましい。

【0021】本発明の有効成分を経口投与する場合には、有効成分の合計として、通常成人1日当たり1~100mg/kg、好ましくは3~30mg/kgを1~3回に分けて投与すれば良い。また、本発明の有効成分を飲食物等に添加して日常的に摂取する場合の摂取量も、経口投与の場合の投与量に準ずる。これらは、年齢、症状等により適宜増減することが可能である。

【0022】また、本発明の有効成分を非経口的に投与する場合には、有効成分の血中濃度を勘案して、経口投与の場合の約10分の1程度の投与量とすれば良く、有効成分の合計として、通常成人1日当たり0.1~10mg/kg、好ましくは0.3~3.0mg/kgを1~3回に分けて投与すれば良い。これらの投与量は、年齢、症状等により適宜増減することが可能である。

【0023】本発明の有効成分は、古来より広く用いられている薬用植物の成分であり、通常量の経口投与では毒性に何ら問題は認められない。また、本発明の有効成分の一種である $\alpha$ -ヘデリンについて溶血性が報告されているが(生物活性天然物質419頁 医歯薬出版 1978年)、この溶血性はグリコシル基の除去によって消失することが知られているため、経血管投与の場合には、そのアグリコンであるヘデラゲニンを用いることが望ましい。

【0024】次に、本発明の有効成分であるヘデラゲニン化合物について、そのカルシウムおよび無機リン酸の遊離抑制作用の評価方法について説明する。

【0025】PTHrpは、ヒトの高カルシウム血症惹起因子として同定された蛋白質であり、この1-34番目のアミノ酸残基よりなるフラグメントであるPTHrp(1-34)は活性型である。そして、このPTHrp(1-34)は、イン・ビトロで骨吸収促進作用が示されているので(ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション、81巻、2号、596-600頁、1988年;エンドクリノロジー、123巻、2841-2848頁、1988年)、骨粗鬆症の評価系として使用することが可能である。

【0026】そこで、本発明の有効成分のイン・ビトロでの骨吸収抑制作用の評価を、培養新生仔マウス頭蓋冠およびPTHrp(1-34)を用いて行った。この評価系は、胎児ラットの前腕骨および $^{45}\text{Ca}$ を使用するロイスの方法(ジャーナル・オブ・クリニカル・インベス

ティゲーション、44巻、1号、103-116頁、1965年)に改良を加えたもので、放射性同位元素を使用せずに、多数の検体を安全に評価できる利点を有する。

【0027】この改良法は、すでに骨疾患治療剤にスクリーニング系として広く用いられている方法(日本骨代謝学会雑誌、8巻、3号、221頁、1990年;同9巻、3号、239頁、1991年;ジャパニーズ・ジャーナル・オブ・ファーマコロジー、55巻、補遺1号、120頁、1991年)であるが、その概略を説明すれば以下の通りである。

【0028】即ち、4〜6日齢ICR系マウスの頭蓋冠を採取し、1日間前培養したのち、検定すべき試料および $10^{-8}$  MのPTHrp(1-34)を添加した培地に交換してさらに2日間培養し、培養終了後、培養上清中のカルシウムおよび無機リン濃度を測定し、PTHrp(1-34)のみの添加群と比較する方法である。

【0029】この方法で、骨吸収抑制作用を評価したところ、後記実施例に示す様に、本発明の化合物を添加した群は、PTHrp(1-34)のみの処理群に較べて培養上清中のカルシウムおよび無機リン濃度が低下していることが判明した。

【0030】

【作用】本発明の有効成分であるヘデラゲニン化合物は、後記実施例に示す様に、副甲状腺ホルモン関連ペプチドであるPTHrp(1-34)が惹起する培養新生仔マウス頭蓋冠からのカルシウムおよび無機リン酸遊離を抑制する作用を有する。

【0031】このように本発明で有効成分として使用されるヘデラゲニン化合物は、カルシウムおよび無機リン酸遊離を抑制する作用を有するので、悪性高カルシウム血症、骨ペーজেット病、骨粗鬆症等の吸収性骨疾患を有効に予防・治療するものと推測される。

【0032】

【実施例】ついで、実施例に基づいて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0033】

参考例1. ハリギリよりのヘデラゲニン化合物の精製  
ハリギリの根(乾燥品・漢方薬種商より入手)10gを細かく裁断し、室温で50%メタノール200mlに2日間浸漬後濾過した。残渣に再び50%メタノール20

0mlを加え、更に室温で2日間浸漬後濾過した。再度残渣に50%メタノール200mlを加え同様に浸漬後濾過した。3回の抽出で得られた濾液を集め、減圧濃縮の後凍結乾燥して、抽出物170mgを得た。

【0034】この抽出物を酢酸エチルに転溶後、SEPPAK C<sub>18</sub>カートリッジ(ミリポアリミテッド社製)に吸着させ、60%メタノール10mlに次いで80%メタノール10mlで溶出した。

【0035】得られた80%メタノール溶出区分を、Delvelosil ODSカラム(2cm×30cm・野村化学社製)を用いる高速液体クロマトグラフィーに付し、60%アセトニトリル/水でイソクラティックに溶出して、24mgの $\alpha$ -ヘデリンおよび6mgのHed-3-araを得た。また、得られた $\alpha$ -ヘデリンを加水分解することによりヘデラゲニンを得た。

【0036】精製工程中、化合物の構造解析はスペクトラムデータを文献値と比較することにより行い、以後の生物検定および製剤には同様にして得られた精製品を使用した。また、生物検定で比較したオレアノール酸は市販(シグマ社製)のものをを使用した。

【0037】実施例1. PTHrp(1-34)により惹起された培養新生仔マウス頭蓋冠からのカルシウムおよび無機リン遊離に対する抑制効果の測定

ICR系マウス(4〜6日齢)の頭蓋冠を切り出して軟組織を除去した後、直径4mmにパンチアウトする。これを、5%FBS-BGJb培地〔5%ウシ胎児血清を含むBGJb培地(Fitton-Jackson modification/Sigma社製)〕を含む48穴プレートに1片ずつ入れて、37℃、5%炭酸ガス/空気の条件下に24時間前培養する。前培養終了後、 $10^{-8}$  MのPTHrp(1-34)および表に示す濃度の試料を含む5%FBS-BGJb培地に交換し、さらに48時間培養する。

【0038】培養終了後、日本電子(株)製のVX1000型生化学自動分析装置を用いて、培養上清のカルシウム濃度をOCPC法で、無機リン濃度をモリブデン酸直接法で測定し、PTHrp(1-34)のみ添加の対照群の値と比較して、骨吸収作用を検討した。この結果を表1に示す。

【0039】

【表1】

7 8

ヘデラゲニン化合物の新生仔マウス頭蓋冠における骨吸収抑制作用

化合物	添加濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	PTHrp 処理	Ca濃度(mg/dl) 平均値 (%)	無機P濃度(mg/dl) 平均値 (%)
コントロール	—	あり	13.12 (100)	4.26 (100)
	—	なし	10.83 (83)	3.40 (80)
$\alpha$ -ヘデリン	0.3	あり	11.90 (91)	3.97 (93)
	1	あり	10.08 (77)	3.12 (73)
	3	あり	9.55 (73)	2.85 (70)
	10	あり	9.01 (69)	2.85 (70)
Hed-3-ara	0.3	あり	11.99 (91)	3.93 (92)
	1	あり	11.83 (90)	3.73 (88)
	3	あり	11.26 (86)	3.68 (86)
	10	あり	10.62 (81)	3.39 (80)
ヘデラゲニン	0.3	あり	11.01 (84)	3.47 (81)
	1	あり	12.01 (92)	3.92 (92)
	3	あり	11.51 (88)	3.64 (85)
	10	あり	10.05 (77)	3.14 (74)
オレアノール酸	0.3	あり	12.15 (93)	3.97 (93)
	1	あり	12.64 (96)	4.19 (98)
	3	あり	12.58 (96)	4.00 (94)
	10	あり	12.35 (94)	3.97 (93)

## N = 2 の平均値

【0040】表1の結果から明らかなように、本発明のヘデラゲニン化合物はいずれもカルシウムおよび無機リン酸の遊離を抑制した。これに対して、4-ジメチル体であるオレアノール酸は、4位の置換基以外はヘデラゲニンと全く同一の構造を有するにも係わらず、そのような作用を示さなかった。

【0041】即ち、表1の結果から、これらのヘデラゲニン化合物が骨吸収抑制の活性を示すためには、4位にRの立体配置でヒドロキシメチル基を有することが必須であると判断された。

【0042】上記結果から、本発明のヘデラゲニン化合物が悪性高カルシウム血症を予防または抑制し得るものであることが強く示唆され、本発明の化合物が骨疾患の子防・治療剤として有用であることが明らかとなった。

## 【0043】実施例2. カプセル剤の製造

〔処方〕

$\alpha$ -ヘデリン	100部 (重量部)
馬鈴薯澱粉	148部 "
ステアリン酸マグネシウム	2部 "

【0044】〔製法〕処方に従って上記成分を播潰機でよく混和した後、1号ハードゼラチンカプセルに250mgずつ充填し、1カプセル中100mgの $\alpha$ -ヘデリンを含有するカプセル剤を得た。

## 【0045】実施例3. 直腸坐剤の製造

ウイテップゾールH-15を加温融解し、これにヘデラゲニンを濃度12.5mg/mlになるように加えて均\*

\*一に混和し、次いでこれを直腸坐剤用金型に2mlずつ注入し、冷却して1剤中25mgのヘデラゲニンを含有する直腸坐剤を製造した。

## 【0046】実施例4. ドリンク剤の製造

〔処方〕

30 $\alpha$ -ヘデリン	2g
DL-酒石酸ナトリウム	10mg
コハク酸	1mg
液糖	80g
クエン酸	1.2g
ビタミンC	1g
香料	1ml
塩化カリウム	0.1g
硫酸マグネシウム	50mg

【0047】〔製法〕処方に従って上記の成分を蒸留水800mlに溶解し、蒸留水を加えて全量1000mlとした後、0.22 $\mu\text{m}$ の除菌フィルターで滅菌し、100mlずつ褐色びんに無菌充填して、1剤あたり200mgの $\alpha$ -ヘデリンを含有するドリンク剤を得た。

## 【0048】実施例5. キャンディーの製造

〔処方〕

$\alpha$ -ヘデリン	1g
精製水	1g
グラニュー糖	49g
水飴	48g
クエン酸	0.5g

レモン香料 0.5g

【0049】〔製法〕常法に従ってグラニュー糖および水飴を加熱熔融し、その他の成分を精製水に懸濁して加えた後、均一に混和して1粒2gのキャンディーを製造した。1粒に20mgの $\alpha$ -ヘデリンを含有する。

【0050】

【発明の効果】本発明の有効成分であるヘデラゲニン化合物は、PTHrp(1-34)により惹起された培養新生仔マウス頭蓋冠からのカルシウムおよび無機リン遊離を抑制することから、骨吸収作用を抑制することが確

認された。そして、これらの有効成分は、古来より広く用いられている薬用植物の成分であり、安全性において特に問題になる点はないものである。

【0051】従って、本発明の吸収性骨疾患の予防・治療剤は、悪性高カルシウム血症、骨ページェット病、骨粗鬆症等の吸収性骨疾患の予防または治療に有用なものである。また、本発明の有効成分を飲食物に添加して日常的に摂取することにより、吸収性骨疾患の予防のための保健用食品等としても有用である。

---

フロントページの続き

(72)発明者 宮川 克郎  
大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号  
サントリー株式会社生物医学研究所内